

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 6-316527

Date of Laid-Open: November 15, 1994

Application No. 3-106314

Filing date: March 26, 1991

Applicants: Tetsuro MOHRI et al.

Inventors: Tetsuro MOHRI et al.

Title of the invention:

Method for producing a neurocyte activator

Page 2, [0004] and [0005]

[0004]

[Means for Solving the Problems] The inventors found that a lipophilic extract of ginseng, which is used as tonics in Chinese medicine, activates neurocytes to promote differentiation and accomplished the present invention. The lipophilic extract can be obtained by extracting ginseng with alcohol, followed by extraction of the alcohol extract with organic solvent with lower polarity than alcohol such as ether.

[0005] The inventors have also found that the thus-obtained lipophilic extract containing a neurocyte activator can be fractionated into fraction A ( $R_f = 0.5$  or more) and fraction B ( $R_f = 0.5$  or less) by subjecting the extract to thin layer chromatography. The fraction A has significant neurocyte activating effect.

Page 2, [0007] lines 11 to 18

However, surprisingly, the lipophilic extract and fraction A obtained according to the present invention have neurocyte activating effect for PC12h

cells comparable to NGF. Therefore, they are very useful to prevent or treat Alzheimer's disease and the like. The lipophilic extract and fraction A obtained according to the present invention can be absorbed well through small intestine and pass through blood-brain barrier. Furthermore, the lipophilic extract and fraction A obtained according to the present invention can be used as injections.

Page 9, [0009]

[0009] Example 1

Production of a neurocyte activator according to the present invention

Two hundred grams of ginseng is refluxed in 150 ml of alcohol for 1 hour, and alcohol is recovered by filtration in a warm condition (this step is repeated three times). The filtrate is concentrated under reduced pressure followed by suspension into 150 ml of distilled water. To this suspension, 100 ml of ether was added (this step is repeated three times). The ether layer is concentrated to obtain approximately 1.03 g of lipophilic extract. Instead of ether, ethyl acetate or other organic solvents having low polarity may be used. The lipophilic extract thus obtained has unique fragrance, tastelessness, color of blackish brown to dark brown, and high viscosity. pH 6 to 7. The extract is well dissolved in a mixture of chloroform/alcohol, partly dissolved in alcohol, and dissolved neither in water nor hot water.

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-316527

(43)公開日 平成6年(1994)11月15日

(51)IntCl.<sup>5</sup>

A 61 K 35/78

識別記号

A A M M 7822-4 C

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平3-106314

(22)出願日 平成3年(1991)3月26日

(71)出願人 591097584

毛利 哲郎

富山県中新川郡立山町浅生140

(71)出願人 591097595

清水 岑夫

富山県富山市南田町1丁目4-7

(71)出願人 591097609

千葉 賢三

石川県金沢市鈴見台5丁目3-25

(72)発明者 毛利 哲郎

富山県中新川郡立山町浅生140

(74)代理人 弁理士 萩野 平 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経細胞賦活物質の製法

(57)【要約】

【目的】 本発明はアルツハイマー病等の予防および治療に有用な神経細胞賦活物質を提供することである。

【構成】 葉用エンジンのアルコール抽出物を減圧濃縮し、水に懸濁させて極性の低い有機溶媒で抽出することを特徴とする神経細胞賦活物質の製法である。

【効果】 本発明による作用物質はNGFと同様な神経細胞賦活作用を有し、アルツハイマー病、老人性痴呆症などの予防および治療に極めて有用である。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 薬用ニンジンアルコール抽出液を減圧濃縮し、こうして得られた濃縮物を水に懸濁させ極性の低い有機溶媒で抽出して脂溶性エキスをを得ることを特徴とする神経細胞賦活物質の製法。

【請求項2】 極性の低い有機溶媒としてエーテル、酢酸エチル、クロロホルムを使用することを特徴とする請求項1に記載の製法。

【請求項3】 請求項1で得た脂溶性エキスを更に薄層クロマトグラフィー処理してRf値0.5以上の画分を得ることを特徴とする神経細胞賦活物質の製法。

【請求項4】 アルコール抽出を還流下で行い、熱時ろ過してアルコール抽出物を得ることを特徴とする請求項1または2に記載の製法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は神経細胞賦活物質の製法に関するものであり、特に、アルツハイマー病、老人性痴呆症または脳栄養不良に基づく脳組織の壊死の予防および治療に役立つ神経細胞賦活物質の製法に関するものである。

**【0002】**

【従来の技術】従来、アルツハイマー病、老人性痴呆症、その他の脳神経細胞の壊死を伴う疾病を、直接その細胞を賦活することにより予防、あるいは治療する薬剤は完成されていない。現状ではニンジンを煎剤とするか、アルコールエキス（含量14%以上）としたものが試用されているに過ぎない。

**【0003】**

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、記憶の障害、行動の不安定、老令化が現われる初期の状態で、内服することにより直接脳細胞に達して神経細胞を賦活する物質を提供することである。

**【0004】**

【課題を解決するための手段】本発明者等は、従来強壮剤として漢方処方に用いられてきた薬用ニンジンをアルコール抽出し、次いでこうして得た抽出物を更に極性の低い有機溶媒、例えばエーテルで抽出することにより得られた脂溶性エキスを、神経細胞を賦活して、その分化を促進することを見出して本発明を完成した。

【0005】上記のようにして得られた神経細胞賦活物質を含有する脂溶性エキスは、更に薄層クロマトグラフィーにかけることによりRf=0.5以上のもの（画分A）とRf=0.5以下のもの（画分B）に分画することができ、この画分Aは更に顕著な神経細胞賦活作用のあることを見出した。

【0006】薬用ニンジンの水溶性エキに含まれるサポニン（ジンセノシドRb<sub>1</sub>など）は、ニワトリ胚脊髄後根の神経細胞を活性化し、その分化を促進して、神経突起の成長を起こすことは、既に報告されている。しか

し薬用ニンジンの脂溶性エキスの神経細胞に対する作用については知られていない。本発明者等は、薬用ニンジンのアルコール抽出物から、更にエチルエーテル、クロロホルムあるいは酢酸エチル等の極性の低い有機溶媒で抽出して得た脂溶性エキス（サポニンは含まれていない）について、ラット副腎髄質褐色腫由来のPC12h細胞の培養を用い、神経突起の成長と、アセチルコリンに対する反応性、及び細胞膜脱分極により誘導されるカルシウム取り込みなどを指標として、神経細胞分化促進作用を見いだした。

【0007】一般に神経成長因子（NGF）は、PC12またはPC12h細胞の形態を4～9日後に扁平にし、神経突起または神経繊維を伸長させ、また、大脳の中隔、対角帯核またはマイネルト核に発するコリン作動性神経に作用してその分化を誘導し、アセチルコリン合成を促進する。従ってアルツハイマー病はNGFの欠損が病態であるとも考えられていて、NGFはアルツハイマー病などの治療薬としても期待されているが、現状ではヒトNGFは供給されていないので、老化予防にはこの因子の分泌を促進するか、またはこれに代わる作用物質が求められている。しかしながら、驚くべきことに、本発明方法によって得られる脂溶性エキス及び画分Aは、NGFに匹敵する神経細胞賦活作用をPC12h細胞に対して示し、アルツハイマー病等の予防および治療に極めて有用な物質であると云える。本発明方法によって得られる脂溶性エキス及びエキスAは小腸より良く吸収され、また脳血液関門も通過することができ、注射剤としても使用することができる。

【0008】本発明方法によって得られる神経細胞賦活物質は、経腸的に、例えば0.1～0.5gの1日投与量で適用することができ、また、非経腸的（静脈注射剤として）に1日投与量10～50mgで投与することができる。以下の実施例によって本発明を更に具体的に説明する。

**【0009】実施例1****本発明による神経細胞賦活物質の製造**

薬用ニンジン200gを150mlのアルコール中、1時間還流後、温時ろ過する（この操作を三回繰返す）。ろ液を減圧濃縮し、これを蒸留水150mlに懸濁し、エーテルを100ml加えて抽出する（この操作を三回繰返す）。このエーテル層を濃縮して約1.03gの脂溶性エキスを得る。エーテルの代わりに酢酸エチル、あるいはその他の極性の低い有機溶媒を用いても良い。こうして得られた脂溶性エキスは独特の芳香があり、無味、褐色～黒褐色で高い粘性を有する。pH6～7。クロロホルム-アルコール混液によく溶解し、アルコールに一部溶解するが、水、熱湯のいずれにも溶解しない。

**【0010】本発明による物質の活性作用****試験細胞の培養**

PC12h細胞は1975年に、ラット副腎髄質褐色細

胞腫から母株が分離され、その後畝中 寛らによってクローン化された樹立細胞で、神経成長因子 (NGF) の刺激により神経細胞様に分化して、神経突起を伸ばす特徴がある。この細胞をポリリジン、あるいはコラーゲンで細胞接着面をコーティングしたプラスチック製の培養フラスコ、あるいはシャーレの中で静置培養した。培地はダルベッコ変法MEM培地に5~10% (v/v) 馬血清と5~10% (v/v) 牛胎児血清を含み、37℃、5~10% CO<sub>2</sub> 混有空気 (水蒸気飽和) 中でpH 7.2~7.4に保った。

#### 【0011】試験方法

本発明による物質を50%ジメチルスルフォキシド水溶液 (一部懸濁あり) とし (40~100mg/ml)、高圧滅菌 (5分) 後試験培地に直接添加した。培地中の最終エキスの濃度は0.025~0.25mg/mlである。35mmシャーレに細胞を約2万個ずつ分注し、翌日細胞が容器に付着してから試験培地 (2ml/シャーレ) に交換して、4日、ないし8日間培地交換しないで培養し、毎日光学顕微鏡により形態観察した。また一部についてはオリンパス社製XL500高速画像解析システムを使って、神経突起成長度を毎日測定した。またメリディアン社製細胞解析装置 (ACAS) を使い、試験培地処理細胞のカルバコール (アセチルコリン・レセプター アゴニスト) 刺激、あるいはKCl 40mM添加直後の細胞内遊離カルシウム濃度の変化をモニターした。

#### 【0012】試験結果

##### 1. 細胞形態および神経突起の成長に及ぼす作用

作用物質溶液の0.025、0.05、0.1、または0.25mg/mlを、試験第1日目に培地に加えて培養4日後に細胞の形態を顕微鏡観察した。対照には培地に0.1%のジメチルスルフォキシドを加えた。この最低濃度では明らかな形態変化は見られなかったが、0.05mg/ml以上の濃度では、濃度増加に応じて細胞が扁平、角型となり、また神経突起の数の増加、またはその伸長が顕著となった。0.025~0.1mg/mlの作用物質溶液を培地に添加し、6日間神経突起の成長 (この場合は毎日各濃度15~25個の細胞の顕微鏡像を画像処理し、細胞当たりの突起の総面積 (平方マイクロメートル/細胞) の平均値とその標準誤差で表した) を測定した結果を、対照の測定結果とともに図1に示す。やはり添加濃度に応じて、また培養日数とともに突起の成長が数値的に証明された。最低濃度においても、5日以後突起の明らかな成長が見られた。

##### 【0013】2. 神経刺激による細胞内遊離カルシウム濃度の変化

作用物質溶液を0.1mg/ml培地に加え、7日間培養後細胞にカルシウム感受性蛍光色素フルオ3を取り込ませてから、培養シャーレに灌流装置を取り付け、カルバコール (最終濃度0.1mM) 添加直後、あるいは高

KCl溶剤 (最終濃度40mM) 添加直後の個々の細胞の中のカルシウム濃度変化を、ACASを用いてモニターした。対照の培地には、0.1%ジメチルスルフォキシドを加え、7日間細胞培養後エキスを群と同様にカルシウム濃度変化を測定した。その結果、カルバコールに対する反応性は、各細胞で対照よりもエキスを前処理の方が一般に大きく (図2 (A)、(B))、それらの蛍光変化 (カルバコール添加前の蛍光強度に対する添加後の蛍光ピークの増加比) を各群間で統計処理すると、表1に示すように、エキスを処理群で有意な増加 (56%増) が見られた。このことは細胞をエキスを前処理することにより、アセチルコリンレセプターが増加し、その結果カルシウムチャンネルが活性化されていることを示す。また高カリウム (KCl) 液による細胞膜脱分極によって誘導されるカルシウム取り込みは、各細胞で対照よりもエキスを処理の方が一般に大きく (図3 (A)、(B))、それらの蛍光変化 (KCl添加前に蛍光強度に対する添加後の蛍光ピークの増加比) を各群間で統計処理すると、表1に示すように、エキスを処理群で有意な増加 (53%増) が見られた。このことは細胞をエキスを処理することにより、カルシウムチャンネルそのものの感受性も増大していることを示す。

#### 【0014】

##### 【表1】

【0015】これらの結果より、アセチルコリンに対する反応性の面からも、PC12h細胞はニンジンエキスを処理により分化が促進され、神経機能が賦活されていることがわかる。

#### 【0016】実施例2

実施例1によって得た脂溶性エキスをシリカゲル薄層クロマトグラフィーに付した。TLCプレート: Merck製、シリカゲル70F254 (0.25mm); 展開溶媒: 石油ベンジン/酢酸エチル (1:1); 呈色: 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 噴霧後110℃、5分加熱。このクロマトグラムを図4に示す。このクロマトグラムにおいて紫色を呈するスポット (Rf値0.56) を含むRf値0.5より大きい部分をまとめて画分Aとし、0.5より小さい部分をまとめて画分Bとする。画分A、Bを掻きとって、それぞれ酢酸エチル、エーテル (1:1) 混液で再抽出し、溶媒を減圧下留去してエキスA、Bを得た。この内エキスAの方に著しいPC12h細胞の突起成長促進作用が認められた。

#### 【0017】

【発明の効果】本発明方法によって得られるニンジンの脂溶性エキス及びエキスAは顕著な神経細胞賦活作用を示し、アルツハイマー病などの予防および治療に極めて有用な物質である。

#### 【図面の簡単な説明】

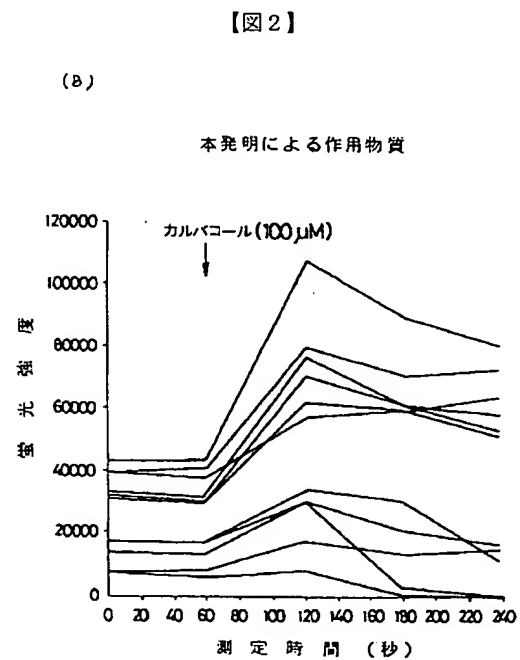
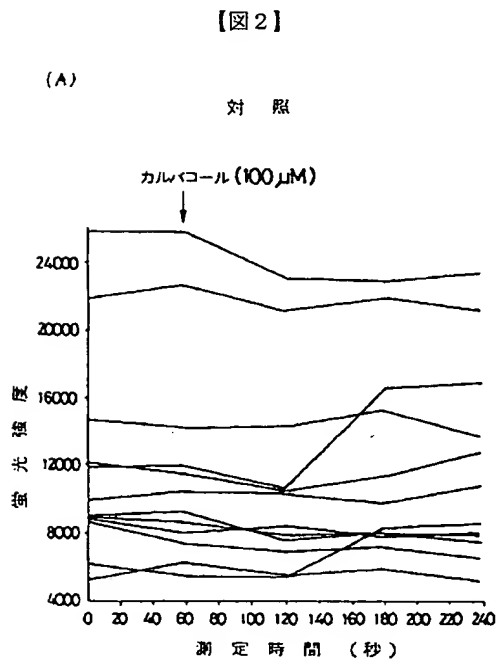
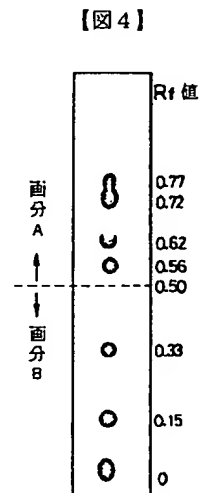
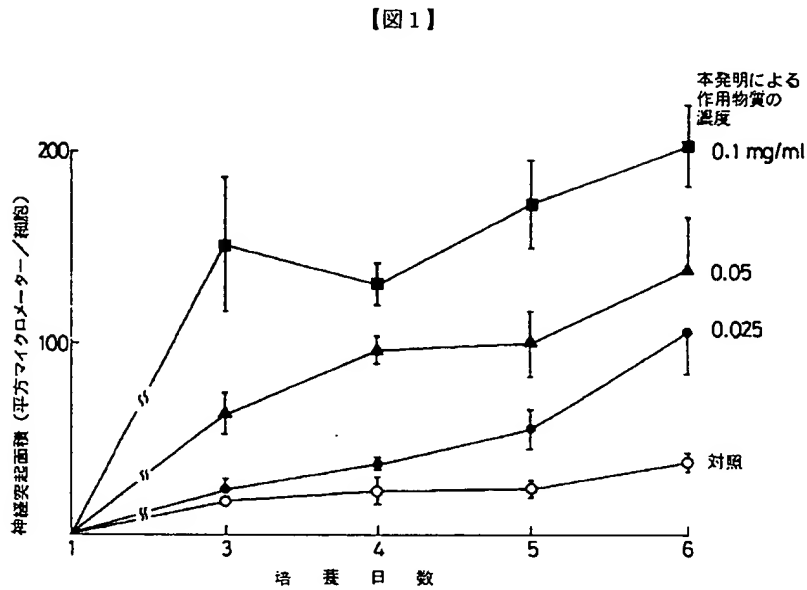
【図1】本発明の作用物質による神経突起の成長 (突起の総面積) の培養日数による変化を示す図である。

【図2】図2 (A) および (B) は対照実験と本発明の作用物質によるカルバコールの蛍光変化を示す図である。

【図3】図3 (A) および (B) は高カリウム液添加の

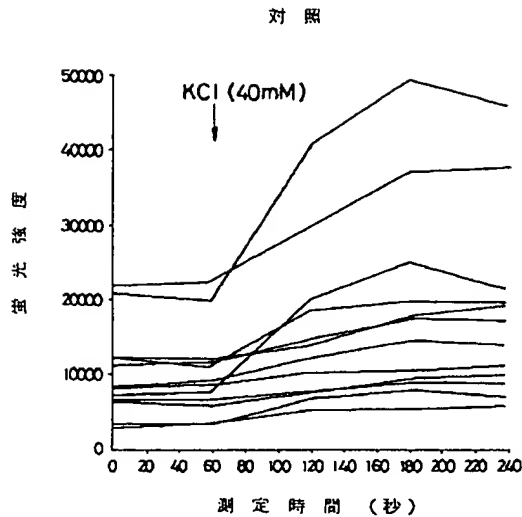
場合の同様な蛍光変化を示す図である。

【図4】本発明による作用物質を薄層クロマトグラフィーにかけたときの画分AとBの状態を示す図である。



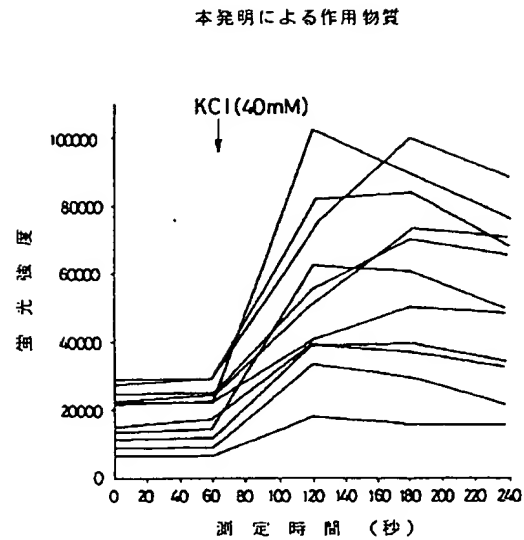
【図3】

(A)



【図3】

(B)



## 【手続補正書】

【提出日】平成3年6月10日

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0007】一般に神経成長因子（NGF）は、PC12またはPC12h細胞の形態を4～9日後に扁平にし、神経突起または神経繊維を伸長させ、また、大脳の中隔、対角帯核またはマイネルト核に発するコリン作動性神経に作用してその分化を誘導し、アセチルコリン合成を促進する。従ってアルツハイマー病はNGFの欠損

が病態であるとも考えられていて、NGFはアルツハイマー病などの治療薬としても期待されているが、現状ではヒトNGFは供給されていないので、老化防止にはこの因子の分泌を促進するか、またはこれに代わる作用物質が求められている。しかしながら、驚くべきことに、本発明方法によって得られる脂溶性エキス及び画分は、NGFに匹敵する神経細胞賦活作用をPC12h細胞に対して示し、アルツハイマー病等の予防および治療に極めて有用な物質であると云える。本発明方法によって得られる脂溶性エキス及び画分Aは小腸より良く吸収され、また脳血液関門も通過することができ、注射剤としても使用することができる。

## 【手続補正書】

【提出日】平成6年5月23日

## 【手続補正1】

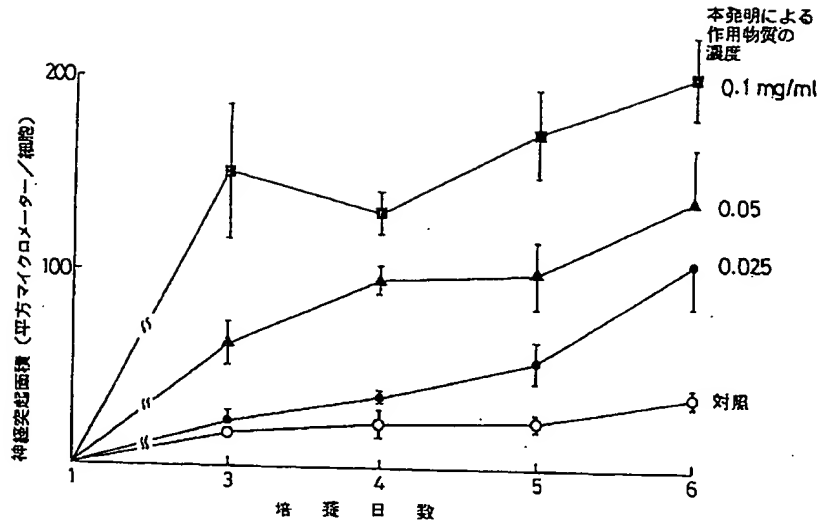
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

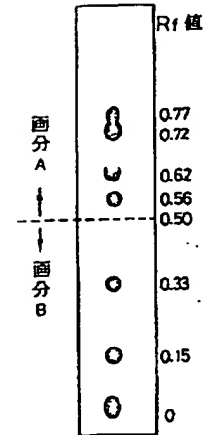
【補正方法】変更

## 【補正内容】

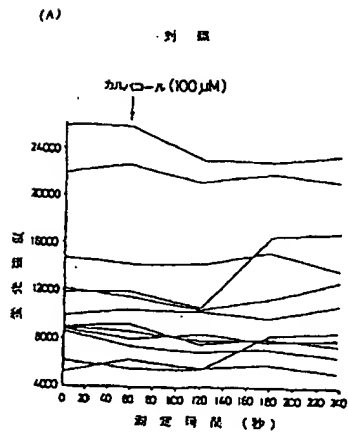
【図1】



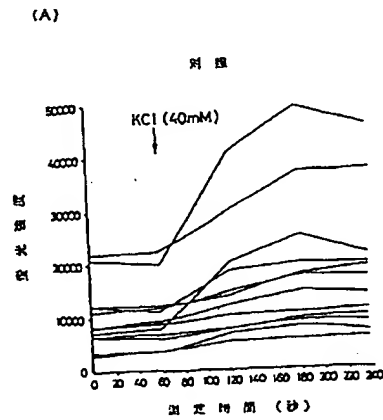
【図4】



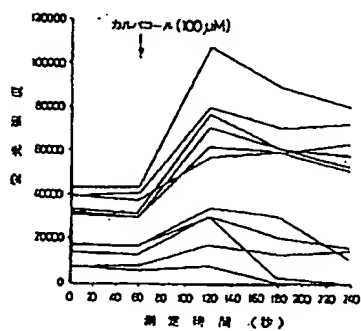
【図2】



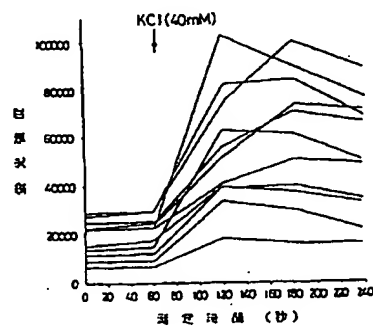
【図3】



(B) 本発明による作用物質



(B) 本発明による作用物質





フロントページの続き

(72)発明者 清水 岑夫  
富山県富山市南田町1丁目4-7

(72)発明者 千葉 賢三  
石川県金沢市鈴見台5丁目3-25